

Rec'd PCT/PTO 07 FEB 2003

PCT/JP 03/09889

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.08.03

REC'D 19 SEP 2003

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月 9日

出願番号
Application Number: 特願2002-233468
[ST. 10/C]: [JP 2002-233468]

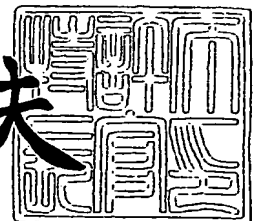
出願人
Applicant(s): アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P14-267809

【提出日】 平成14年 8月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/68
G01N 31/22
C07D327/04

【発明の名称】 蛋白質測定用試験片

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 小坂 秀子

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086380

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 稔

【連絡先】 0 6 - 6 7 6 4 - 6 6 6 4

【選任した代理人】

【識別番号】 100103078

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 達也

【選任した代理人】

【識別番号】 100105832

【弁理士】

【氏名又は名称】 福元 義和

【選任した代理人】

【識別番号】 100117167

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩谷 隆嗣

【選任した代理人】

【識別番号】 100117178

【弁理士】

【氏名又は名称】 古澤 寛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 024198

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0103432

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質測定用試験片

【特許請求の範囲】

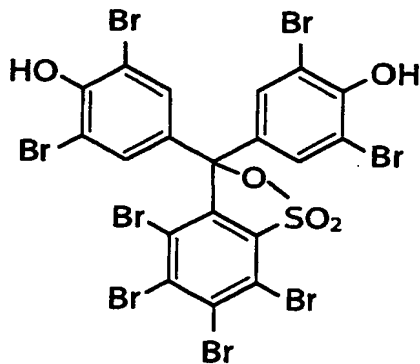
【請求項1】 蛋白質を定量するために使用され、かつ酸性pH指示薬を含む蛋白質測定用試験片であって、

蛋白質に対する発色感度を高めるための増感剤として、界面活性剤を含んでいることを特徴とする、蛋白質測定用試験片。

【請求項2】 上記酸性pH指示薬は、トリフェニルメタン系指示薬である、請求項1に記載の蛋白質測定用試験片。

【請求項3】 上記トリフェニルメタン系指示薬は、下記化学式1で示されるテトラブロムフェノールブルーである、請求項2に記載の蛋白質測定用試験片。

【化1】



【請求項4】 上記増感剤として、カチオン系の界面活性剤を含んでいる、請求項1ないし3のいずれかに記載の蛋白質測定用試験片。

【請求項5】 上記増感剤として、ノニオン系の界面活性剤を含んでいる、請求項1ないし4のいずれかに記載の蛋白質測定用試験片。

【請求項6】 上記増感剤として、臭化ベンジルトリメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム、またはゼフィラミンを含んでいる、請求項4または5に記載の蛋白質測定用試験片。

【請求項7】 上記増感剤として、ポリエチレングリコールを含んでいる、請求項5または6に記載の蛋白質測定用試験片。

【請求項 8】 上記増感剤としての界面活性剤を、0.01～1wt%含んでいる、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の蛋白質測定用試験片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料（たとえば血液、尿）中に存在する蛋白質を測定するための蛋白質測定用試験片に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体試料中の蛋白質を測定することは、病理学的診断において重要である。たとえば、肝臓機能が低下した場合には、血清アルブミンの量が減少する一方、腎炎、ネフローゼ症候群、結石、腫瘍等の腎・尿路疾患、循環系及び中枢神経系の疾患などの場合には、尿中の蛋白質の量が増加する。したがって、アルブミンなどの蛋白質を測定することは、これらの疾患の診断において重要な指針となり得るのである。

【0003】

蛋白質測定分野においては、蛋白質誤差指示薬を用いた簡便な測定方法が知られている。この測定方法では、蛋白質誤差指示薬として、たとえばテトラブロムフェノールブルー（TBPB）が用いられており、一例を挙げれば、TBPBを用いた尿試験紙が一次スクリーニング用として広く用いられている。TBPBは、蛋白質が存在すると、本来は解離しない低い pH 3 付近でフェノール性ヒドロキシ基の解離が起こり、黄色から青色に変化するため、蛋白質を検出することができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、TBPBを指示薬として用いた試験紙は、臨床的に必要とされる 10～20mg/dL の低濃度蛋白質に対する検出感度が不十分なため、蛋白質を正確に検出できない場合がある。たとえば、カラーチャートとの比較により行われる目視判定においては、陰性蛋白質と痕跡蛋白質の色が近いために区別が

難しく判定が困難である。一方、尿試験紙の測定装置を用いる場合においても、TBPBの感度が低いためにしばしば判定を誤る場合がある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

そのため、低濃度な蛋白質をより高感度に定量できる技術が望まれていた。そこで、本発明者が鋭意検討した結果、試験片に界面活性剤を含有させれば、低濃度の蛋白質を高感度で測定することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

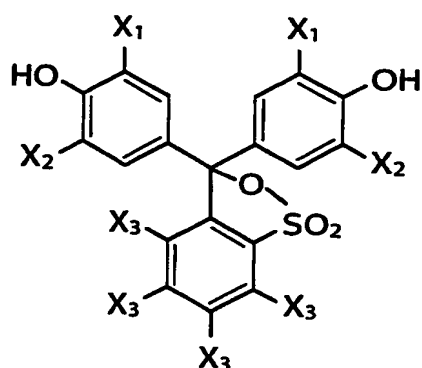
すなわち、本発明により提供される蛋白質測定用試験片は、蛋白質を定量するために使用され、かつ酸性pH指示薬を含む蛋白質測定用試験片であって、蛋白質に対する発色感度を高めるための増感剤として、界面活性剤を含んでいることを特徴としている。

【0007】

酸性pH指示薬としては、たとえばトリフェニルメタン系指示薬が挙げられる。トリフェニルメタン系指示薬としては、典型的には、下記化学式2で示されるものが挙げられる。

【0008】

【化2】



【0009】

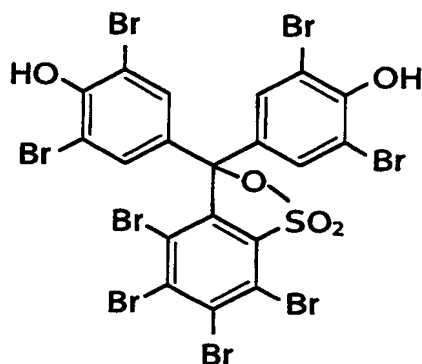
化学式2において、X₁はハロゲン、ニトロ基またはニトロソ基であり、X₂およびX₃は同一または異なるハロゲンである。

【0010】

トリフェニルメタン系指示薬としては、下記化学式3で示されるテトラブロムフェノールブルー (TBPB) を使用するのが好ましい。

【0011】

【化3】



【0012】

本発明の蛋白質定量用試験片は、上述の酸性 pH 指示薬、増感剤（界面活性剤）、緩衝剤などを含有する含浸液に吸収性担体を浸み込ませ、これを乾燥させることにより製造することができる。試験片はそのまま使用することができるが、非吸収体に接着させて使用することもできる。

【0013】

界面活性剤（増感剤）としては、カチオン系の界面活性剤を用いるのが好ましく、これに加えて、あるいはこれに代えてノニオン系の界面活性剤を使用してもよい。

【0014】

カチオン系の界面活性剤としては、たとえば第4級アンモニウム塩が挙げられる。第4級アンモニウム塩としては、たとえばアルキルジメチルベンジルアンモニウム、アルキルトリメチルアンモニウム塩、ジアルキルジメチルアンモニウム塩、ベンザルコニウム塩、イミダゾリウム塩が挙げられる。カチオン系の界面活性剤としては、脂肪族アミン塩を使用することもできる。

【0015】

ノニオン系の界面活性剤としては、エーテル型、エーテルエステル型、エステ

ル型、含窒素型のいずれをも使用することができる。

【0016】

エーテル型の界面活性剤としては、たとえばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン2級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレンラノリン誘導体、アルキルフェノールホルマリン縮合物の酸化エチレン誘導体、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテルが挙げられる。

【0017】

エーテルエステル型の界面活性剤としては、たとえばポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルが挙げられる。

【0018】

エステル型の界面活性剤としては、たとえばポリエチレングリコール脂肪酸エステル、脂肪酸モノグリセリド、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステルが挙げられる。

【0019】

含窒素型の界面活性剤としては、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレン脂肪酸アミド、ポリオキシエチレンアルキルアミン、アルキルアミンオキサイドが挙げられる。

【0020】

本発明におけるカチオン系の界面活性剤としては、典型的には、臭化ベンジルトリメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム、またはゼフィラミンが使用され、ノニオン系の界面活性剤としては、典型的には、ポリエチレングリコールが使用される。もちろん、複数種の界面活性剤を併用してもよく、その場合には、カチオン系の界面活性剤とノニオン系の界面活性剤とを組み合わせ使用するのが好ましい。典型的

には、カチオン系界面活性剤である臭化ベンジルトリメチルアンモニウムと、ノニオン系の界面活性剤であるポリエチレングリコールを組み合わせ使用される。含浸液中の増感剤（界面活性剤）の濃度は、特に限定されないが、典型的には 0.01～5 wt%、好ましくは 0.01～1 wt% とされる。

【0021】

増感剤としては、界面活性剤に加えて、ポリカーボネートやポリビニルアルコールなどの高分子材料を使用してもよい。

【0022】

含浸液中の TBPB の濃度は、特に限定されないが、典型的には 0.1～5 mM、好ましくは 0.3～0.1 mM とされる。

【0023】

含浸液の pH は、たとえば TBPB の pKa 値よりやや低いである 2.0～4.5 とされ、好ましくは 2.0～3.5 とされる。

【0024】

緩衝剤としては、pH 2.0～4.5 の範囲で良好な緩衝能を有し、ハロゲン化キサンテン系色素と蛋白質との反応を阻害しないものであれば何れでもよい。緩衝剤としては、たとえばグリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、あるいは酒石酸緩衝液を用いることができる。含浸液中の緩衝剤の濃度は、特に限定されないが、典型的には 0.1～1.5 M、好ましくは 0.3～1 M である。

【0025】

吸収性担体としては、蛋白質成分を含まない多孔性物質を使用することができ、たとえばシート状または膜状の形態のものが使用される。多孔性物質としては、たとえば紙状物、フォーム（発泡体）、織布状物、不織布状物、編物状物が挙げられる。吸収性担体を形成するための材料としては、たとえば綿、麻、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ロックウール、ガラス繊維、シリカ繊維、カーボン繊維、ボロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、レーヨン、ポリエステル、ナイロン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリオレフィンが挙げられる。これら吸収

性担体の形状は、特に限定されないが、矩形、長矩形、円形あるいは楕円形が一般的である。

【0026】

非吸収体としては、たとえばシート状または膜状の形態のものが使用される。非吸収体を形成するための材料としては、たとえばポリエチレンテレフタレート、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレンが挙げられる。

【0027】

【実施例】

実施例 1

本実施例では、アルブミン濃度が 0.3 mg/dL (陰性) または 15 mg/dL (陽性) の尿を試験片に含浸させ、それぞれについて反射率を測定した。試験片は、含浸液を濾紙 (Whatman社製「3MMChr」) に含浸させた後にそれを乾燥させることにより形成した。含浸液としては、表1に示した基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤である臭化ベンジルトリメチルアンモニウムを 0.2 wt\% 添加したものを使用した。反射率は、色差計を用いて、測定波長を 630 nm として測定した。測定結果については、表2に示した。

【0028】

実施例 2

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤である臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを 0.01 wt\% 添加したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0029】

実施例 3

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤である臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを 0.01 wt\% 添加したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示

した。

【0030】

実施例 4

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてノニオン系界面活性剤であるポリエチレングリコールを0.5wt%添加したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0031】

実施例 5

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤である臭化ベンジルトリメチルアンモニウムを0.2wt%およびノニオン系界面活性剤であるポリエチレングリコールを0.5wt%を併用したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0032】

実施例 6

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤である臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを0.01wt%およびノニオン系界面活性剤であるポリエチレングリコールを0.5wt%を併用したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0033】

実施例 7

本実施例においては、含浸液として、表1の基本組成に対して、増感剤としてカチオン系界面活性剤であるゼフィラミンを0.01wt%およびノニオン系界面活性剤であるポリエチレングリコールを0.5wt%を併用したものをを用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0034】

比較例 1

本比較例においては、含浸液として基本組成のもの（界面活性剤（増感剤）を

含まないもの)を用いた以外は、実施例1と同様とした。その結果を表2に示した。

【0035】

【表1】

基本組成

指示薬	緩衝剤(pH3.4)	溶媒
TBPB 0.5mM	リンゴ酸緩衝液 0.8M	エタノール 30wt%

【0036】

【表2】

測定結果

	増感剤	反射率 (%)		差分△ (%)
		0.3mg/dl (陰性)	15mg/dl (陽性)	
実施例 1	臭化ベンジルトリメチルアンモニウム 0.2wt%	60.7	39.3	21.4
実施例 2	臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム 0.01wt%	60.4	40.6	19.8
実施例 3	臭化ラウリルトリメチルアンモニウム 0.01wt%	59.0	38.7	20.3
実施例 4	ポリエチレングルコール0.5wt%	57.0	40.4	16.6
実施例 5	臭化ベンジルトリメチルアンモニウム 0.2wt% ポリエチレングルコール0.5wt%	60.6	38.3	22.3
実施例 6	臭化ラウリルトリメチルアンモニウム 0.01wt% ポリエチレングルコール0.5wt%	59.1	35.9	23.2
実施例 7	ゼフィラミン0.01wt% ポリエチレングリコール0.5wt%	61.2	41.5	19.8
比較例 1	なし	60.7	48.9	11.8

【0037】

表2から明らかなように、アルブミン濃度が15mg/dLのときの反射率は、界面活性剤を含有させた場合には、界面活性剤を含有させない場合に比べて小

さくなっている。そのため、陰性時 (0.3 mg/dL) と陽性時 (15 mg/dL) との差分 Δ (%) は、界面活性剤を含ませた場合には、界面活性剤を含ませない場合の 2 倍程度となっている。したがって、界面活性剤を含ませた場合には、アルブミンに対する感度が高くなり、アルブミン濃度が $10 \sim 20 \text{ mg/dL}$ 程度の低濃度であっても、適切にアルブミンを検出できるといえる。とくに、カチオン系の界面活性剤を単独で、あるいはこれに加えてノニオン系の界面活性剤を併用した場合には、アルブミンの検出感度が高くなっている。この点からは、増感剤としては、カチオン系の界面活性剤を使用するのが好ましいといえる。

【0038】

【発明の効果】

本発明では、増感剤として界面活性剤を使用することにより、低濃度な蛋白質であっても、高感度に検出することができる。

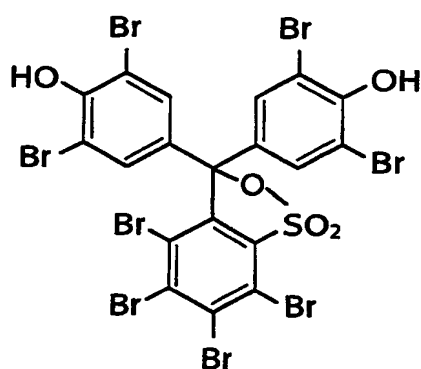
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低濃度な蛋白質をより高感度に定量できるようにする。

【解決手段】 本発明の蛋白質測定用試験片は、蛋白質を定量するために使用され、かつPH指示薬を含む試験片であって、蛋白質に対する発色感度を高めるための増感剤として、界面活性剤を含んでいることを特徴としている。PH指示薬としては、下記化学式4で示されるテトラブロムフェノールブルーのようなトリフェニルメタン系指示薬を用いるのが好ましい。

【化4】



【選択図】 なし

特願 2002-233468

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

- | | |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月11日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 |
| 氏 名 | 株式会社京都第一科学 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2000年 6月12日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 |
| 氏 名 | アークレイ株式会社 |